

## 알코올 고정 후 Papanicolaou 염색된 표본에서의 결핵균 DNA 검색

인하대학교 의과대학 병리학교실

황태숙 · 박인서 · 한혜승 · 한지영 · 김영배

### Detection of *Mycobacterium tuberculosis* DNA in Ethanol-Fixed and Papanicolaou Stained Archival Materials

Tae-Sook Hwang, In-Seo Park, Hye-Seung Han, Jee-Young Han, and Young-Bae Kim

Department of Pathology, Inha University College of Medicine, Incheon 402-752, Korea

Granuloma is a chronic inflammatory process associated with non-infectious agents or infectious diseases such as tuberculosis. It is well known that AFB staining, which has been used to determine the etiology of the granulomatous inflammation, lacks both sensitivity and specificity. Due to the slow growth rate of most pathogenic mycobacteria, culturing of organisms can take up to eight weeks. It is not uncommon for specific therapy to be delayed, or for an inappropriate treatment be given to patients without mycobacterial infections or with infections caused by atypical mycobacteria. Determination of the causative agent in Papanicolaou stained cytology specimens gives pathologists even more difficulties when only necrotic material has been aspirated from the center of the granuloma. In recent years, the use of a polymerase chain reaction for the amplification of DNA has appeared promising in terms of speed, efficiency, sensitivity, and specificity. Since a polymerase chain reaction permits the sensitive genetic analysis of small amounts of tissue, it is ideally suited to the genetic analysis of cytologic specimens. A polymerase chain reaction is easily performed on unfixed and unstained cells, however, an analysis of ethanol fixed and Papanicolaou-stained archival smears has also been described. We have recently established a method to detect *Mycobacterium tuberculosis* organism by a nested polymerase chain reaction with primers in the insertion sequence IS 6110, using cellular digests of ethanol-fixed and Papanicolaou-stained archival specimens aspirated from the lymph nodes, lungs, thyroid, etc. Inhibitors present in Papanicolaou stained material was removed by destaining the slides with 0.5% HCl solution for 10~30 minutes. Eight out of ten cases which have shown the epithelioid granulomas revealed a positive reaction and four out of ten cases which have shown lymphohistiocytic cells in a necrotic background without any evidence of granuloma revealed a positive reaction. This study showed that it was possible to employ a polymerase chain reaction to detect *Mycobacterium tuberculosis* in Papanicolaou stained archival cytology specimens. (Korean J Pathol 1998; 32: 603~607)

**Key Words:** *Mycobacterium tuberculosis*, PCR, Papanicolaou stained archival materials

### 서 론

*Mycobacterium tuberculosis*에 의해 발생하는 감염성

질환은 전세계적으로 중요한 사망원인 중 하나이며<sup>1</sup> 우리나라에서도 아직 결핵은 중요한 감염성 질환으로 높은 이병률과 사망률을 보이고 있다. 결핵은 sarcoidosis, 곰팡이 감염, 또는 일부의 기생충 감염과 임상 혹은 병리학적으로 감별이 어려운 경우가 많으며 더구나 가장 정확한 진단적 방법인 결핵균 배양에 의한 균의 검출은 8주 이상의 시간을 요하는 경우가 많고 포르말린이나 알코올에 이미 고정된 조직으로는 시행할 수 없는 제한

접 수: 1998년 3월 11일, 게재승인: 1998년 6월 29일  
주 소: 인천광역시 남구 용현동 253, 우편번호 402-752  
인하대학교 의과대학 병리학교실, 황태숙  
ISSN : 0379-1149

점이 있다. 그 간 조직이나 객담 등의 표본에서 결핵균을 확인하기 위해 항산균 염색을 시행하여 왔으나 그 민감도와 특이도 모두에 있어 신뢰도가 무척 낮아<sup>2</sup> 결핵균의 신속하고도 정확한 동정방법이 요구되어 왔다. 최근 분자생물학적 기법의 발달로 결핵균을 검출하는데 있어 새로운 문이 열려 중합효소연쇄반응으로 결핵균 DNA를 빠른 시간내 쉽게 확인하는 방법이 소개되었다.<sup>3-5</sup> 중합효소연쇄반응을 이용한 결핵균의 검출은 주로 객담, 체액 및 신선조직을 이용하여 이루어지고 있으며 포르말린에 고정되고 파라핀에 포매된 조직에서도 일부 이루어지고 있다. 그러나 기왕에 Papanicolaou 염색이 된 세포검사표본에서 광학현미경 검색시 결핵이 의심되는 경우 신선한 표본이 없는 경우가 대부분이어서 종래의 방법에 의한 결핵균의 확인이 불가능하였다. 저자들은 이미 알코올에 고정되고 Papanicolaou 염색 후 봉입된 슬라이드에서 DNA를 채취하여 결핵균을 확인하는 방법을 확립하여 진단에 이용하고자 본 연구를 시행하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 재 료

인하대병원 해부병리과에서 검색된 세포검사샘플 중 육아종성 병변이 관찰되는 10예 (9예의 림프절흡인천자 표본, 1예의 갑상선흡인천자 표본)와 육아종성 병변은 없으나 괴사성 배경에 림프조직구가 관찰되는 10예 (2예의 폐흡인천자 표본, 6예의 림프절흡인천자 표본, 1예의 흉강액, 1예의 객담)를 대상으로 하였다.

전에 모두 95% 알코올에 고정하여 Papanicolaou 염색 후 봉입한 슬라이드에서 세포를 채취하였다.

### 2. 방 법

1) Papanicolaou 염색된 슬라이드에서의 세포 채취: 슬라이드에 부착된 라벨을 깨끗이 제거한 후에 xylene에 담가 37°C 수조에서 5~10 시간 정도 방치시킨 후 cover glass를 벗겨내었다. 100%, 95%, 80% 알코올의 단계를 거친 후 수세를 하고 염색액을 제거하기 위하여 0.5% HCl 용액에 10~30분간 담가두었다. 염색액이 제거된 후 수세를 하고 깨끗한 일회용 면도칼을 이용하여 슬라이드에 부착된 세포를 긁어내었다. 긁어낸 세포는 TE buffer가 담긴 1.5 ml microcentrifuge tube에 넣고 vortexing 후 15,000 rpm에서 30초간 원심분리를 한 후에 상층액을 파이펫으로 제거하였다.

2) DNA 추출: 긁어낸 세포가 들어있는 1.5 ml microcentrifuge tube에 G'nome kit (Bio101, CA, USA) 중 cell suspension solution 0.9 ml을 가하고 잘 혼합한 후, RNase 25  $\mu$ l를 가하고 잘 혼합하여 cell lysis/denaturing solution 50  $\mu$ l를 가하고 55°C에 30분간 방치하였다. 여기에 protease mixture 12.5  $\mu$ l를 가하고 잘 혼합한 후 proteinase K 200  $\mu$ g을 가하여 55°C에서 24시간 방치하

였다. G'nome kit 중 salt out mixture 250  $\mu$ l를 가하고 10분 동안 얼음에서 방치한 후 10분간 원심분리한 다음 상층액을 15 ml 원심 분리관에 옮겼다. 이 시험관에 2 ml TE buffer와 8 ml 무수에탄올을 가하고 -20°C에서 1시간 동안 방치한 후 15분간 1500 rpm으로 원심분리한 다음 상층액을 버리고 상온에서 완전히 말려서 DNA pellet을 얻었다. 각각을 100  $\mu$ l TE buffer로 녹인 후 2  $\mu$ l를 취하여 O.D.를 측정하고 나머지는 -20°C에 보관하여 주형 DNA로 사용하였다.

### 3) 중합효소연쇄반응:

(1) Nested PCR for detection of mycobacterial DNA; *Mycobacterium tuberculosis*의 삽입서열 (insertion element) IS 6110 부위의 특수한 올리고뉴클레오타이드 시발체 쌍들 (oligonucleotide primer pairs)을 이용하여 block 방식으로 (Gene Amp PCR system 9600, U.S.A) nested PCR을 시행하였다. 100~200 ng의 주형 DNA를 이용하여 먼저 1차 올리고뉴클레오타이드 시발체 쌍 (5'-CTCAA-GGAGCACA TCAGC-3'와 5'-GGTCGGAAGCTCCTATG A-3')을 이용하여 일차 중합효소연쇄반응을 일으킨 후 반응산물 2  $\mu$ l를 넣고 처음 시발체보다 안쪽에서 선택한 시발체 쌍 (5'-CTACGCTGTTTACGGTGCCC-3'와 5'-GCCT-TTGTCACCGACGCCTA-3')을 이용하여 이차 중합효소연쇄반응을 시행하였다. 두 반응 모두에서 우선 94°C에서 5분간 전 변성 (predenaturation) 과정을 거친 후, 94°C에서 1분간 변성 (denaturation), 60°C에서 1분간 결합 (annealing), 72°C에서 1분간 연장 (extension) 반응의 과정을 30회 거치고 나서 마지막 연장과정으로 72°C에서 5분간 반응시켰다. 반응이 끝난 후 1.5% 한천 겔 (agarose gel)에서 전기영동을 실시하여 DNA 띠 (285bp)를 확인하였다. 같은 방법으로 고정되고 추출된 표본 중 결핵균 DNA가 검출된 DNA 표본을 양성대조검사에 이용하였으며 음성대조검사는 DNA 대신 증류수를 사용하였다.

결과가 음성인 예는 DNA의 질을 확인하기 위해  $\beta$ -globin의 존재를 확인하였다.

(2) Single PCR for detection of  $\beta$ -globin; 인형  $\beta$ -globin 유전자에 위치하는 시발체 쌍을 이용하여 hot air 방식 (Rapid cycler, Idaho Co., U.S.A)으로 single PCR을 시행하여 268 bp 크기의 띠를 확인하였다.

## 결 과

1차 중합효소연쇄반응결과 557bp 정도 크기의 띠가 한천 겔상에서 확인되었고 2차 중합효소연쇄반응의 결과 285bp 정도 크기의 띠가 관찰되었다. 거의 모든 예에서 primer-dimer로 생각되는 100 bp보다 작은 띠가 관찰되었다.

육아종성 병변을 보였던 10예 중 8예에서 중합효소연쇄반응 결과 결핵균 DNA가 확인되었으며 8예 모두 림프절에서 흡인천자된 표본이었다 (Fig. 1). 육아종성 병

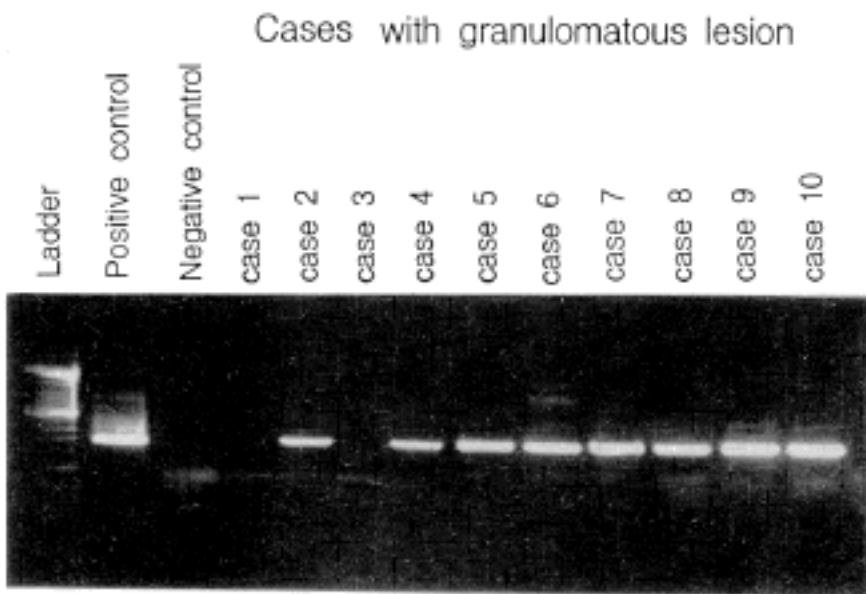


Fig. 1. Ethidium bromide-stained/UV-illuminated gel of PCR amplified products from samples showing epithelioid granulomas on Papanicolaou stained slides. Case 1 is from thyroid aspirate and rests are from lymph node aspirates.

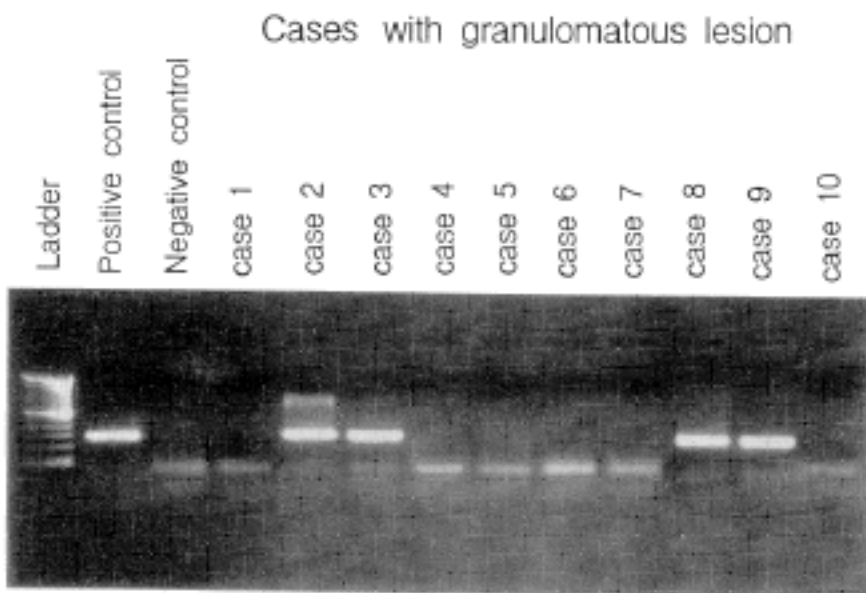


Fig. 2. Ethidium bromide-stained/UV-illuminated gel of PCR amplified products from samples showing lymphohistiocytic cells in necrotic background without evidence of granuloma. Cases 1 to 6 are from lymph node aspirates, cases 7 and 10 are from lung aspirates, case 8 is from pleural effusion, and case 9 is from sputum.

변을 보이지 않았던 10예 중 4예에서 중합효소연쇄반응 결과 결핵균 DNA가 확인되었으며 이 중 2예는 림프절 흡인천자 표본, 1예는 흉강액, 1예는 객담이었다 (Fig. 2).

### 고 찰

세포검사 표본에서의 결핵균의 진단은 일반적으로 육아종성 병변의 관찰에 의한다. 그러나 결핵의 경우에도 세포검사상 육아종성 병변이 관찰되지 않는 경우가 다수 있으며 육아종성 병변이 관찰되는 경우에도 육아종을 형성하는 다른 감염성 혹은 비감염성 질환과의 감별이 용이하지 않다. 조직에서의 결핵의 진단은 항산균 염색에 의해 도움을 받기도 하나 항산균 염색 자체가

민감도와 특이도가 낮아 진단적 가치는 별로 없다.<sup>2</sup> 최근 분자생물학적 기법의 발달로 결핵을 비롯한 많은 감염성 질환의 신속하고도 정확한 진단이 용이하여졌으며<sup>6-9</sup> 특히 객담, 체액 등에서 중합효소연쇄반응을 이용한 원인균의 확인은 배양의 배양에 의한 진단법을 대체하고 있으며 포르말린에 고정되고 파라핀에 포매된 조직에서도 일부 시행되고 있다.<sup>10-14</sup>

그러나 이미 Papanicolaou 염색이 된 세포검사 표본에서 결핵이 의심되는 경우 신선한 표본이 없는 경우가 대부분이어서 진단상의 어려움이 많다.

저자들은 최근에 이미 알코올에 고정되고 Papanicolaou 염색 후 봉입된 슬라이드에서 DNA를 채취하여 결핵균 DNA를 확인함으로써 병리과에서 흔히 경험하는 진단적 어려움을 해결할 수 있게 되었다. Sciacchitano 등에 의하면 Papanicolaou 염색에 사용되는 Orange G는 단독으로 사용할 경우 중합효소연쇄반응의 억제물질로 작용할 수 있으나 다른 염료와 혼합될 경우는 억제효과를 보이지 않는다고 하며, 다른 PAP 염료는 완전한 염료 혼합물 (complete dye mixture)을 사용하지 않는 한 DNA 증폭을 억제하지는 않는다고 한다.<sup>15</sup> 또한 Chen 등의 연구에 의하면 Papanicolaou 염색에 사용되는 hematoxylin과 aluminium sulfate가 중합효소연쇄반응을 억제한다고 하였으며 염료의 탈색과정을 거침으로써 이를 해결할 수 있었다.<sup>16</sup> 본 연구에서는 중합효소연쇄반응에 억제제로서 작용할 수 있는 PAP 염색을 제거하기 위해 슬라이드를 0.5% HCl 용액에 약 5~10분간 처리하였다.

본 연구 결과 육아종성 병변을 보였던 10예 중 2예에서 결핵균 DNA를 확인할 수 없었는데 이는 결핵이 아닌 다른 원인에 의한 육아종성 병변이었거나 결핵성 육아종이나 결핵균의 수가 아주 적어 본 방법에 의해 검색되지 않았을 가능성이 있다. 중합효소연쇄반응은 매우 민감도가 높은 검사방법으로서 일반적으로 10<sup>7</sup>배까지 증폭이 가능하며 웬만한 조직에서는 1~10개의 DNA 서열만 존재하여도 확인가능하다고 하나 이는 일반적인 조건에서는 잘 이루어지지 않고 hot start를 시행하는 경우에만 해당된다고 하며<sup>17</sup> Miyazaki 등에 의하면 nested PCR을 시행할 경우 single PCR에 비해 민감도가 1000배나 증가한다고 하였다.<sup>18</sup> 중합효소연쇄반응에 의한 결핵균 검색의 민감도는 보고자에 따라 차이는 있어 Yuen 등은 호흡기 분비물의 경우 배양을 gold standard로 하였을 때 배양에 비해 약 77~84%의 민감도를 보였고 도말표본상 항산균이 염색되지 않는 예에서는 배양에 비해 37~58%의 민감도를 보였으며 같은 표본이라도 사용하는 PCR kit나 시발체의 종류에 따라 차이를 보였다고 하였으며<sup>22</sup> 최 등은 중합효소연쇄반응이 배양보다 오히려 민감도와 특이도가 높다고 하였다.<sup>23</sup> 그러나 실제 임상표본을 이용하는 경우 주형 DNA 농도는 일정하더라도 결핵균 DNA 농도가 다양하므로 중합효소연쇄반응의 민감도를 정확히 측정하기는 어려우며 더구



나 Papanicolaou 염색된 세포검사 표본에서의 민감도 검사는 전혀 이루어져 있지 않다. 본 연구에서는 중합효소연쇄반응의 민감도를 높이고자 일반적으로 사용하는 Hot start 및 nested PCR 방법을 이용하였으며 본 연구실에서 IS 6110 부위에서 디자인한 시발체 쌍을 이용하여 single PCR과 nested PCR을 시행한 경우 nested PCR이 더 민감함을 보였으나 (data not shown) 민감도에 대한 정확한 검정은 할 수 없었다. 민감도를 낮추는 요인은 specimen source, 고정을 비롯한 준비 과정, heparin hemoglobin, phenol, sodium dodecyl sulfate 등의 억제제의 존재 등이 해당된다고 하였다.<sup>24</sup> 이 중 고정액의 종류 및 고정기간은 중합효소연쇄반응의 민감도에 큰 영향을 미치는 것으로 알려져 있으며 포르말린에 고정된 DNA의 경우 파쇄 (fragmentation)가 심해 가능한 한 500 bp 이하의 산물이 나오도록 시발체를 디자인하도록 권하고 있으나 알코올의 경우는 포르말린에 비하여 DNA 손상이 덜하여 95% 알코올에서 30일간 고정한 경우에도 1327 bp의 조각 (fragment)까지 증폭시킬 수 있다고 하였다.<sup>25</sup> 본 연구에서는 1차, 2차 반응산물이 557 bp와 285 bp 크기여서 큰 문제는 없으리라 생각된다.

본 연구에서 육아종성 병변이 관찰되었으나 결핵균 DNA를 확인할 수 없었던 경우 항산균 염색에 음성이었으나 항산균 염색은 가음성이 많고 이미 고정된 상태 등으로 배양은 할 수 없어 정확한 진단을 내릴 수 없었다.

또한 본 연구 결과 육아종성 병변을 보이지 않고 괴사성 배경만 보인 표본에서도 10예 중 4예에서 결핵균 DNA가 관찰되어 이미 널리 알려져 있는 사실이기도 하나 세포검사시 육아종성 병변이 관찰되지 않는 경우에도 괴사성 배경이 있는 경우 결핵을 의심하여야 함을 확인할 수 있었다. 가양성 (false positivity)은 교차오염이 가장 큰 요인이며 객담검사의 경우 전 감염시 존재했던 nonviable mycobacterial DNA가 중합효소연쇄반응시 가양성 반응을 일으킬 수 있으나 흡인천자 표본이나 체액표본은 이에 해당되지 않는다.<sup>23</sup> 최근에는 결핵균 DNA 검색에 흔히 사용되는 IS 6110 부위가 결핵균 외에 다른 mycobacteria와 유사성 (homology)이 있다는 보고가 있어 IS 6110 부위의 시발체 쌍을 이용한 결핵균 검색의 특이도에 문제가 제기되고 있다.<sup>26</sup>

본 연구에서는 음성 대조군을 사용하였고 같이 병행한 다른 표본에서는 DNA 띠가 관찰되지 않아 교차오염의 가능성은 희박하다고 생각되며 다른 요인에 의한 가양성이라기 보다는 흡인천자시 주위의 육아종성 병변은 제외되고 중심 괴사부위만 채취되었을 가능성이 높다고 생각된다.

## 결 론

Papanicolaou 염색 후 봉입된 슬라이드에서 DNA를 채취하여 중합효소연쇄반응 (nested PCR)으로 결핵균을

검색하였으며 그 결과 육아종성 병변이 관찰되었던 10예 중 8예에서 결핵균 DNA가 관찰되었으며 육아종성 병변이 관찰되지 않았으나 괴사성 배경을 보여 결핵이 의심되었던 10예 중 4예에서 결핵균 DNA가 관찰되었다. 이상의 결과로 기왕에 알코올에 고정되고 Papanicolaou 염색된 슬라이드에서 DNA를 추출하여 중합효소연쇄반응으로 결핵을 진단할 수 있음을 확인하였고 육아종성 병변이 관찰되었던 경우에도 결핵균 DNA가 관찰되지 않아 비결핵성 육아종의 가능성을 시사하였고 육아종성 병변이 관찰되지 않았던 경우에도 결핵균 DNA가 확인되어 육아종성 병변이나 괴사성 배경 중 한가지 변화만 관찰될 경우에도 중합효소연쇄반응을 통한 결핵균 DNA의 확인이 필요하다고 생각된다.

## 참 고 문 헌

- Murray CJL, Lopez AD. Global and regional cause of death patterns in 1990. Bull World Health Organ 1994; 72: 447-80.
- Bates JH. Diagnosis in tuberculosis. 1992; Chest 76(Suppl): 757-63.
- Drake TA, Hindler JA, Berlin OG, Bruckner DA. Rapid identification of *Mycobacterium avium* complex in culture using DNA probes. J Clin Microbiol 1987; 25: 1442-5.
- Roberts MC, McMillan C, Coyle MB. Whole chromosomal DNA probes for rapid identification of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium* complex. J Infect Dis 1992; 166: 1177-80.
- Shoemaker SA, Fisher JH, Scoggin CH. Techniques of DNA hybridization detect small numbers of mycobacteria with no cross-hybridization with non-mycobacterial respiratory organisms. Am Rev Respir Dis 1985; 131: 760-3.
- Lampertico P, Malter JS, Colombo M, Gerber MA. Detection of hepatitis B virus DNA in formalin fixed, paraffin-embedded liver tissue by the polymerase chain reaction. Am J Pathol 1990; 137: 253-8.
- Kershisnik MM, Knisely AS, Sun CCJ, Andrews JM, Wittwer CT. Cytomegalovirus infection, fetal liver disease, and neonatal hemochromatosis. Hum Pathol 1992; 23: 1075-80.
- Bavim PJ, Giles JA, Deerly A, et al. Use of semiquantitative PCR for human papillomavirus DNA type 16 to identify woman with high grade cervical disease in a population presenting with a mildly dyskaryotic smear report. Br J Cancer 1993; 67: 602-5.
- Lee S, Goldstein H, Baseler M, Adelsberger J, Golding H. Human immunodeficiency virus type I infection of mature CD3 hi CD8+ thymocytes. J Virol 1997; 71: 6671-6.
- 조은경, 최대경, 백태현, 박정규, 김화중. 중합효소연쇄반응을 이용한 객담내 결핵균 검출에 관한 연구. 대한미생물학회지 1993; 28: 131-42.

11. 김성준, 김장성, 오달균, 문해란, 문홍모. 중합효소연쇄반응을 이용한 비배양 객담에서의 *Mycobacterium tuberculosis* 의 조기 검출. 대한미생물학회지 1993; 28: 373-80.
12. Hamazaki S, Koshiha M, Habichi T, Tokahashi R, Sugiyama T. The effect of formalin fixation on restriction endonuclease digestion of DNA and PCR amplification. Pathol Res Pract 1993; 189: 553-7.
13. Osaki M, Adachi H, Gomyo Y, Yoshida H, Ito H. Detection of Mycobacterial DNA in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue specimens by duplex polymerase chain reaction: application to histopathologic diagnosis. Mod Pathol 1997; 10: 78-83.
14. Tötsch M, Schmid KW, Brömmelkamp E, et al. Rapid detection of Mycobacterial DNA in clinical samples by multiplex PCR. Diagn Mol Pathol 1994; 3: 260-6.
15. Sciacchitano S, Paliotta PS, Nardi F, Sacchi A, Andreoli M, Pontecorvi A. PCR amplification and analysis of RAS oncogenes from thyroid cytologic smears. Diagn Mol Pathol 1994; 3: 114-21.
16. Chen JT, Lane MA, Clark DP. Inhibitors of the polymerase chain reaction in Papanicolaou stain : removal with a simple destaining procedure. Acta Cytol 1996; 40: 873-7.
17. Miyazaki Y, Koga H, Kohno S, Kaku M. Nested polymerase chain reaction for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples. J Clin Microbiol 1993; 31: 2228-32.
18. Nuovo GJ. PCR in situ hybridization: protocols and applications. New York: Raven Press, 1992; 73-4.
19. Wright PA, Wynford-Thomas D. The polymerase chain reaction: miracle or mirage? J Pathol 1990; 162: 99-117.
20. Van den Brule AJC, Meijer CJL, Bakels V, Kenemans P, Walboomers JMM. Rapid detection of human papilloma virus in cervical scrapes by combined general primer-mediated and type-specific polymerase chain reaction. J Clin Microbiol 1990; 28: 2739-43.
21. Nuovo GJ, Darfler MM, Impraim CC, Bromly SE. Occurrence of multiple types of human papillomavirus in genital tract lesions: analysis by in situ hybridization and polymerase chain reaction. Am J Pathol 1991; 58: 518-23.
22. Yuen KY, Yam WC, Wong LP, Seto WH. Comparison of two automated DNA amplification systems with a manual one-tube nested PCR assay for diagnosis of pulmonary tuberculosis. J Clin Microbiol 1997; 35: 1385-9.
23. 최철석, 김은아, 이경옥. 임상가검물에서 중합효소연쇄반응을 이용한 결핵균 진단의 평가. 대한미생물학회지 1993; 28: 381-9.
24. Cegielski JP, Delvin BH, Morris AJ, et al. Comparison of PCR, culture, and histopathology for diagnosis of tuberculous pericarditis. J Clin Microbiol 1997; 35: 3254-7.
25. Greer CE, Lund JK, Manos MM. PCR amplification from paraffin-embedded tissues: recommendations on fixatives for long-term storage and prospective studies. Research, PCR Method and Application 1992; 46-50.
26. Mchugh TD, Newport LE, Gillespie SH. IS6110 homologs are present in multiple copies in mycobacteria other than tuberculosis-causing mycobacteria. J Clin Microbiol 1997; 35: 1769-71.